柑橘木虱酵母双杂交 cDNA 文库的构建及评价

马晓芳[1]，陈国庆[2]，张学潮[1]，徐海君[1,*]
(1. 浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310058；2. 浙江省柑桔研究所，浙江台州 318020)

摘要：为了探索研究柑橘木虱 *Diaphorina citri* 与柑橘黄龙病(Huanglongbing, HLB)病原菌的相互作用蛋白，本研究运用 RNA 转录中 5′末端转换机制(Switching Mechanism at 5′ End of the RNA Transcript, SMART)技术构建了柑橘木虱的酵母双杂交 cDNA 文库。以实验室饲养的柑橘木虱为材料，提取总 RNA，经反转录后合成 ds cDNA，两端添加同源重组序列，并用层析柱纯化；ds cDNA 与文库质粒 pGADT7-Rec 在酵母 Y187 感受态细胞内发生同源重组，柑橘木虱 cDNA 重组到文库质粒上，完成酵母双杂交 cDNA 文库的构建。结果表明，文库容量达到 10^6，扩增文库滴度为 2.23×10^7 cfu/mL，cDNA 插入片段的平均长度大于 750 bp，达到试剂盒建库要求。另外，我们利用构建的酵母双杂交文库，以 HLB 病原菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus (*C*Las)的两个膜蛋白 ORF420 和 ORF3420 作为诱饵进行筛选试验，但是并没有得到阳性克隆。柑橘木虱酵母 cDNA 文库的构建为开展柑橘木虱与柑橘黄龙病病原菌互作机制的研究奠定了基础。

关键词：柑橘木虱；柑橘；黄龙病；酵母双杂交 cDNA 文库；膜蛋白；蛋白质互作
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2013)03-0228-06

Construction and evaluation of yeast two-hybrid cDNA library of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

MA Xiao-Fang[1], CHEN Guo-Qing[2], ZHANG Xue-Chao[1], XU Hai-Jun[1,*] (1. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Orange Research Institute, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

Abstract: In order to study the interacting proteins between the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) and *Candidatus* Liberibacter asiaticus (*C*Las) which is the pathogenic bacterium causing Huanglongbing, yeast two-hybrid cDNA library of *D. citri* was constructed using the Switching Mechanism at 5′ End of the RNA Transcript (SMART) technique. The total RNA was isolated from the citrus psyllid adults bred in the laboratory and subjected to reverse transcription, and the double-strand cDNAs (ds cDNAs) were synthesized. The ds cDNAs were ligated with homologous adapter and purified by the chromatography column. By using homologous recombination reaction, the ds cDNAs were transformed into the Y187 competent cell with the library plasmid pGADT7-Rec to construct yeast two-hybrid cDNA library. Detection of the library indicated that it contained more than 10^6 independent clones, the titer of the amplified library was 2.23×10^7 cfu/mL, and the average size of inserts was above 750 bp in the cDNA library. These results demonstrate that the library meets the requirements of the standard cDNA library. Moreover, two membrane proteins, ORF420 and ORF3420, from (*C*Las) were used as bait proteins to screen the interacting proteins in the library, but no positive clone was screened in the tests. The yeast two-hybrid cDNA library of *D. citri* will be useful for the research on the interaction between insect vectors and *C.* Liberibacter asiaticus in the future.

Key words: *Diaphorina citri*; citrus; Huanglongbing (HLB); yeast two-hybrid cDNA library; membrane protein; protein interaction

柑橘黄龙病(Huanglongbing, HLB)是世界柑橘生产上最具毁灭性的病害，对柑橘产业造成严重的经济损失。有报道称，我国有柑橘栽培的 19 个省、区已有 11 个遭受危害，受害面积占柑橘总栽培面

基金项目：农业公益性项目"柑橘黄龙病和溃疡病综合防控技术研究与示范"(201003067)
作者简介：马晓芳，女，1988 年 5 月，浙江海宁人，硕士研究生，主要从事柑橘木虱分子生物学研究，E-mail：mxfmlrbry@zju.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: haijunxu@zju.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-12-05；接受日期 Accepted: 2013-02-14

积的 80% 以上，产量占总产量的 85% 左右(范国成等，2009)。柑橘黄龙病自 1919 年在我国发现以来，已在亚洲、非洲、大洋洲、美洲的 40 多个国家和地区有分布(Bove，2006)。经过电镜学和血清学验证，证明柑橘黄龙病病原菌是一种革兰氏阴性菌，属于变形菌门(Proteobacteria)变形菌纲 α-亚纲(α-Proteobacteria)韧皮部杆菌属 *Candidatus* Liberibacter(Bove，2006)。目前已发现 3 种病原菌及非洲种的 1 个亚种，其中亚洲种分布最广，也是我国的主要病原菌。

媒介昆虫与植物病原菌之间存在互利共生、寄生及共生关系。当病原菌感染昆虫时，可能会引起昆虫的免疫应答反应，也可能会对一些重要生物学过程中的基因表达产生影响。另外，病原菌也可能通过激活寄主植物的防御信号通路和初级、次级代谢途径，从而影响昆虫的取食(Nachappa *et al.*，2012)。因此，关于病原菌与昆虫互作机制的研究对控制病害传播有着重要的借鉴意义。柑橘木虱 *Diaphorina citri* 是 HLB 病原菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus(*C*Las)的媒介昆虫(McLean and Oberholz，1965；Martinez and Wallace，1967)。最近，Tiwari 等(2011)发现 HLB 会降低柑橘木虱细胞色素 P450 家族基因的表达，表明 HLB 也像其他病原菌一样影响了宿主的一些生物学过程，但其互作机制有待深入研究。

自 Fields 和 Song(1989)建立酵母双杂交系统以来，已有许多研究者利用这项技术来探索蛋白质之间的互作，例如：验证已知两种蛋白质之间的互作情况，发现新的蛋白质和蛋白质的功能，建立蛋白质互作图谱，确定基因治疗中的靶标位点等等(李铁强等，2007)。酵母双杂交技术不但应用于哺乳动物、植物、病毒、细菌等的蛋白质互作研究，在昆虫方面的应用也很突出。聂瑞娥等(2008)构建日本通草蛉 *Chrysoperla nipponensis*(Okamoto) cDNA 酵母文库，进行 ESTs 分析，为草蛉的遗传改良和分类提供了基础；邹朗云等(2011)通过构建棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠 cDNA 文库来研究棉铃虫中肠中抗 Bt 蛋白的有关蛋白；李硕等(2011)构建灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallén 高带毒群体 cDNA 酵母文库，为开展昆虫介体与水稻条纹病毒互作机制的研究奠定了基础。本研究构建了柑橘木虱 cDNA 酵母文库，并以 HLB 病原菌 *C*Las 两个膜蛋白 ORF420 和 ORF3420 为诱饵，分别筛选互作蛋白，为进一步研究与黄龙病病原菌蛋白互作的柑橘木虱蛋白打下了一个良好的基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

柑橘木虱采集自海南省海口市的九里香 *Murraya paniculata* 上，饲养于 3 年生健康黄岩蜜橘 *Citrus reticulata* cv. Subcompressa，人工气候室条件如下：温度 26±1℃，相对湿度 60%±5%，光周期 16L∶8D。

1.2　菌株和载体

菌株 Y187 和载体 pGADT7-Rec 均购自 Clontech 公司。含重组质粒 pGBKT7-420 的 Y2H Gold 诱饵菌株和含重组质粒 pGBKT7-3420 的 Y2H Gold 诱饵菌株由本实验室保存。

1.3　主要试剂

SMART^{TM} cDNA 文库构建试剂盒、培养基、X-α-Gal 均购自 Clontech 公司；Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司；酵母质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.4　总 RNA 提取

取 30 头柑橘木虱成虫，加 1 mL Trizol 研磨，提取总 RNA(具体方法参见 Trizol 试剂说明书)。取 2 μL 用 NanoDrop 2000(Thermo Scientific)测浓度和 OD 值，1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。

1.5　ds cDNA 的合成及纯化

用 Clontech 公司 Make Your Own "Mate & Plate" Library System 试剂盒(Cat. No. 630490)进行反转录合成 cDNA 第一链。取 2 μL 总 RNA 共 2.68 μg，加 1 μL CDS Ⅲ(Oligo-dT Primer)，加 DEPC-H_2O 至总体积为 4 μL，72℃水浴 2 min，冰浴 2 min 后瞬离，向混合液中加入 2 μL 5×First-Strand Buffer，1 μL DTT，1 μL dNTPs Mix，1 μL SMART MMLV Reverse Transcriptase，42℃放置 10 min，加 1 μL SMART Ⅲ-modified oligo，42℃放置 1 h，75℃水浴放置 10 min，冷却至室温，加 1 μL RNase H，37℃放置 20 min，即合成 cDNA 第一链。用 Clontech 公司 Advantage® 2 Polymerase Mix 试剂盒 PCR 扩增 cDNA 第二链。反应体系如下：2 μL cDNA 第一链，加 70 μL ddH_2O，10 μL 10×Advantage * 2 PCR Buffer，2 μL 50×dNTPs Mix，2 μL 5′ PCR Primer，2 μL 3′ PCR Primer，10 μL 10×Melting Solution，2 μL 50×Advantage 2 Polymerase Mix，反应条件如下：95℃ 30 s；95℃ 10 s，68℃ 6

min，每次循环后延伸时间加 5 s，共 22 次循环；68℃ 5 min。取 7 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ds cDNA 的质量。

用 Clontech 公司的 CHROMA SPIN™ + TE-400 Columns，筛选大于 200 bp 的 cDNA。重悬层析柱，放入一个 2 mL 收集管中，700 g 离心 5 min，换收集管，向层析柱中间加入 93 μL ds cDNA 样品，700 g 离心 5 min。向纯化样品中加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠，2.5 倍体积的预冷无水乙醇，－20℃ 放置 1 h，14 000 r/min 室温离心 20 min，弃上清，室温干燥 10 min，加入 20 μL ddH_2O，用 NanoDrop 测浓度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化后 ds cDNA 的质量。

1.6 酵母 Y187 感受态细胞的制备

取新鲜培养的直径 2 mm 以上酵母 Y187 单菌落于 3 mL YPDA 液体培养基中，30℃ 250 r/min 培养 8 h，取 5 μL 到 50 mL YPDA 液体培养基中，30℃ 250 r/min 培养 16 ~ 20 h 至 OD_{600} 0.15 ~ 0.3，700 g 室温离心 5 min，收集菌体并重悬在 100 mL YPDA 液体培养基中，30℃ 250 r/min 培养 3 ~ 5 h 至 OD_{600} 0.4 ~ 0.5，700 g 室温离心 5 min 收集菌体，用 ddH_2O 重悬，700 g 室温离心 5 min，收集菌体，每 50 mL 菌液用 1.5 mL 1.1 × TE/LiAc 重悬，高速离心 15 s 后用 600 μL 1.1 × TE/LiAc 重悬，获得感受态细胞。

1.7 ds cDNA 的转化

将 20 μL ds cDNA、6 μL 线性化 pGADT7-Rec 和 20 μL 预变性 Carrier DNA 混合液加入到 600 μL 酵母 Y187 感受态细胞中，加入 2.5 mL PEG/LiAc 溶液，温和混匀，30℃ 水浴 45 min，加入 160 μL DMSO，混匀，42℃ 水浴 20 min，700 g 室温离心 5 min 收集菌体，加入 3 mL YPD Plus Medium，30℃ 振荡培养 90 min，700 g 室温离心 5 min，收集菌体重悬于 15 mL 0.9% NaCl 溶液中。涂 SD/-Leu 平板，并取一定转化原液按照 1∶10 和 1∶100 (v/v) 稀释后涂板，计算转化效率。

1.8 文库鉴定

分别挑取 30℃ 培养 3 ~ 5 d 直径大于 2 mm 的文库单菌落 20 个，摇菌后用酵母质粒提取试剂盒提取酵母质粒，再经 PCR 验证文库质粒同源重组 cDNA 的大小，引物为 pGADT7 质粒上的 LD-F (5′-CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCC-3′) 和 LD-R (5′-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT-3′)，1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入 cDNA 片段的多态性。

1.9 文库菌体的收集

30℃ 培养 3 ~ 5 d 后，将平板于 4℃ 放置 3 ~ 4 h，每个平板加 5 mL 预冷的 YPDA/25% 甘油，用玻棒收集菌落。取部分收集的菌液按 1∶10，1∶100，1∶1 000 和 1∶10 000 (v/v) 进行梯度稀释，涂板 SD/-Leu，测定文库滴度。回收的文库菌体存放于 －80℃。

1.10 互作蛋白的筛选

两个诱饵菌株在 30℃ 培养 3 ~ 5 d，分别挑取直径大于 2 mm 的单菌落于 50 mL SD/-Trp 液体培养基中，30℃ 250 r/min 振荡培养 16 ~ 20 h 至 OD_{600} 达到 0.8，室温 1 000 g 离心 5 min 收集菌体，弃上清后用 4 mL SD/-Trp 液体培养基重悬，加入 1 mL 文库菌液，30℃ 40 r/min 振荡培养 20 ~ 24 h，至观察到"三叶草"接合子。室温 1 000 g 离心 10 min 收集菌体，用 10 mL 0.5 × YPDA/Kan 液体培养基重悬，涂 SD/-Trp-Leu/X-α-Gal (DDO/X) 平板，30℃ 培养。观察菌落生长情况，挑选蓝斑到 SD/-Trp-Leu-Ade-His/X-α-Gal (QDO/X) 平板，并添加阳性和阴性对照，30℃ 培养观察。

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱成虫总 RNA 的提取

采用 Trizol 试剂提取获得柑橘木虱成虫的总 RNA，经 NanoDrop 测定分析，总 RNA 浓度为 1.34 μg/μL，OD_{260}/OD_{280} 介于 1.80 ~ 2.00 之间，纯度较高。琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)，可见两条清晰的带，分别是 18S rRNA 和 28S rRNA，总 RNA 质量较高，可用于 cDNA 的合成。

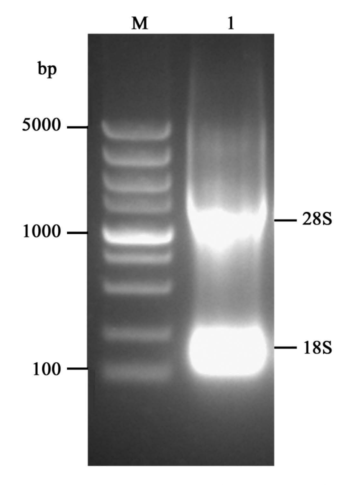


图 1 柑橘木虱成虫总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA isolated from *Diaphorina citri* adults

M：5 kb DNA Ladder；1：总 RNA Total RNA.

2.2　柑橘木虱成虫 ds cDNA 的合成及纯化

PCR 反应所得 ds cDNA 经琼脂糖凝胶电泳检测发现(图 2)，条带成弥散状，大部分在 250 ~ 5 000 bp范围内，中间部分较亮，说明不同大小和不同丰度的 RNA 被反转录，可以用于 cDNA 文库的构建。经 CHROMA SPIN^{TM} + TE-400 Columns 纯化后，获得 3.5 μg 的 ds cDNA，达到建库所需的 2 ~5 μg 要求。

2.3　柑橘木虱成虫 cDNA 文库转化效率、文库鉴定及文库滴度检测

转化后菌液按 1∶10 和 1∶100 (v/v)梯度稀释涂板，经计算，转化后克隆数大于 10^6，达到建库要求。PCR 鉴定文库多态性(图 3)，发现 20 个克隆均有条带，且条带大小差异明显，插入条带平均长度大于 750 bp，说明文库多态性较好，信息丰富。

将收集后的文库菌液按照 1∶10，1∶100，1∶1 000和 1∶10 000 进行梯度稀释涂板，计算得文库滴度为 2.23×10^7，达到建库要求。

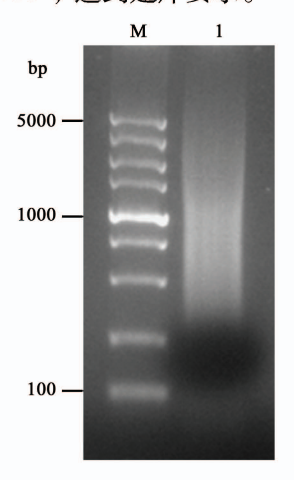


图 2　柑橘木虱成虫 ds cDNA 电泳图

Fig. 2　Electrophoresis of ds cDNA from *Diaphorina citri* adults

M：5 kb DNA Ladder；1：合成的 ds cDNA Synthesized ds cDNA.

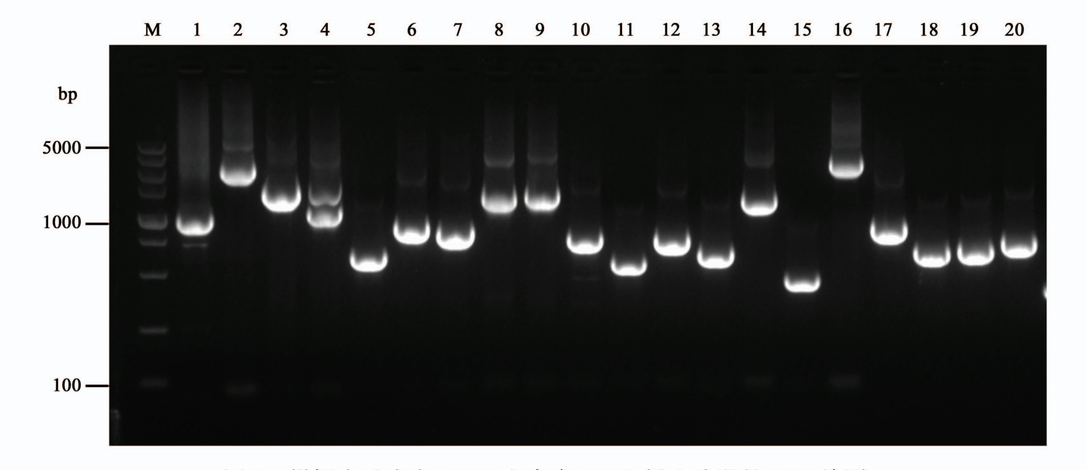


图 3　柑橘木虱成虫 cDNA 文库中 cDNA 插入片段的 PCR 检测

Fig. 3　PCR identification of cDNA inserts in the cDNA library of *Diaphorina citri* adults

M：5 kb DNA Ladder；1 –20：重组子 Recombinants.

2.4　HLB ORF420 与 ORF3420 互作蛋白筛选

为了得到与 HLB 膜蛋白互作的柑橘木虱蛋白，我们尝试利用 HLB ORF420 与 ORF3420 这两个膜蛋白与构建的酵母文库进行杂交。构建的 pGBKT7-420 和 pGBKT7-3420 诱饵载体转入酵母细胞后，经检测并无自激活现象和对酵母的毒害现象。这两个诱饵菌株与文库菌液混合后可观察到“三叶草”接合子的形成，并且也能在 DDO/X 培养基上生长。但是，当我们用更苛刻的 QDO/X 培养基筛选时，发现只有阳性对照的克隆生长且变蓝，其余菌落均无生长(图 4)，说明本实验没有筛选出与 HLB ORF420 与 ORF3420 互作的木虱蛋白。

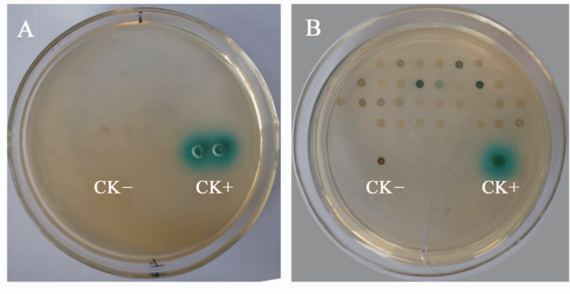


图 4　QDO/X 培养基上与 HLB ORF420 (A)和 ORF3420 (B)互作的柑橘木虱蛋白筛选

Fig. 4　Screening of the interacting proteins from *Diaphorina citri* with HLB ORF420 (A) and ORF3420 (B) on QDO/X plates

CK -：阴性对照 Negative control；CK +：阳性对照 Positive control.

3 讨论

由于酵母双杂交实验的成功实施取决于 cDNA 文库信息的高丰富性，因此反转录 RNA 的质量至关重要。本研究用新鲜提取的柑橘木虱成虫总 RNA 作为反转录模板，又采用 Clontech 公司 Make Your Own “Mate & Plate” Library System 试剂盒进行反转录，尽可能地提高了反转录效率，保障获得的 ds cDNA 能够较完整地反映柑橘木虱总 RNA 信息。本研究获得的 ds cDNA 经检测达到酵母转化所需浓度，且片段范围广，包含信息丰富。文库容量是转化效率和重组效率的双重保障，文库滴度是后续杂交实验的重要条件。本研究构建的柑橘木虱文库，无论是文库容量，还是文库滴度，都达到了 Make Your Own “Mate & Plate” Library System 试剂盒说明书的建库要求。因此，从 ds cDNA 质量和文库容量、滴度都可以很好地反映本研究所构建的酵母文库具有较好的质量，为之后的筛选工作打下一个良好的基础。

细菌的膜蛋白在其侵染宿主过程中扮演着重要的角色。例如，人们利用酵母双杂交技术，发现莱姆病螺旋体的膜蛋白 A（OspA）和 C（OspC）分别与蜱中肠的 TropsA 和唾液腺体蛋白 Salp15 结合，帮助病原菌完成寄生和侵染的过程(Pal *et al.*, 2004a, 2004b)。在本研究中，我们选择了 HLB 膜蛋白 ORF420 和 ORF3420 作为诱饵蛋白进行了杂交实验，但是并没有筛选出与之互作的木虱蛋白，我们推测其原因可能为：一是 ORF420 与 ORF3420 具有跨膜结构域使其无法进入酵母细胞核，尽管我们利用生物信息学软件并没有预测出此结构域；二是 ORF420 与 ORF3420 只在植物体内表达，而在柑橘木虱体内是沉默的。当然，确切的原因有待实验验证。

昆虫是植物病原菌的重要传播媒介。随着科学研究的不断深入，生物间的互作关系显得愈发重要。Zhao 等(2012)通过研究水稻条纹病毒 NSvc2 蛋白在细胞表面的融合作用，探索了病毒进入灰飞虱细胞的原理。Nachappa 等(2012)对马铃薯木虱 *Bactericera cockerelli* 进行了转录组测序和表达谱分析，期望筛选出与木虱互作的有关基因。柑橘木虱作为 HLB 的重要昆虫媒介，虽然有关其传菌能力、体内共生菌群落组成、菌体定位、功能基因等都有了一些报道(Subandiyah *et al.*, 2000; Bove, 2006; Pelz-Stelinski *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2011)，但有关柑橘木虱与黄龙病病原菌的互作却鲜有研究。寻找与病原菌蛋白互作的柑橘木虱蛋白，将有助于研究该昆虫的传菌原理和传菌方式，对进一步开展控虫防病有着重要的意义。本研究利用 Clontech 公司酵母双杂交系统构建了柑橘木虱成虫的 ds cDNA 文库，尝试利用黄龙病病原菌膜蛋白作为诱饵，筛选互作蛋白，为进一步明确柑橘木虱传菌机理做准备。

参考文献（References）

Bove JM, 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7-37.

Fan GC, Liu B, Wu RJ, Li T, Cai ZJ, Ke C, 2009. Thirty years of research on citrus Huanglongbing in China. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 24(2): 183-190. [范国成, 刘波, 吴如健, 李韬, 蔡子坚, 柯冲, 2009. 中国柑橘黄龙病研究30年. 福建农业学报, 24(2): 183-190]

Fields S, Song O, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 (6230): 245-246.

Li S, Sun LJ, Li X, Xiong RY, Xu QF, Zhou YJ, 2011. Construction of yeast two-hybrid cDNA library of high-viruliferous (RSV-infected) populations of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11): 1324-1328. [李硕, 孙丽娟, 李醒, 熊如意, 徐秋芳, 周益军, 2011. 灰飞虱高带毒(RSV)群体酵母双杂交 cDNA 文库的构建. 昆虫学报, 54(11): 1324-1328]

Li TQ, Wu YY, Fan HC, Wang LQ, 2007. Development of yeast two-hybrid system. *China Journal of Bioinformation*, 6(1): 46-48. [李铁强, 吴永英, 范洪臣, 王立群, 2007. 酵母双杂交系统研究进展. 生物信息学, 6(1): 46-48]

Martinez AL, Wallace JM, 1967. Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. *Plant Disease Reporter*, 51: 692-695.

McLean APD, Oberholz PCJ, 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *South African Journal of Science*, 8: 297-298.

Nachappa P, Levy J, Tamborindeguy C, 2012. Transcriptome analyses of *Bactericera cockerelli* adults in response to “*Candidatus* Liberibacter solanacearum” infection. *Molecular Genetics and Genomics*, 287 (10): 803-817.

Nie RE, Yang XK, Liu ZQ, 2008. cDNA library construction and analysis of some ESTs of *Chrysoperla nipponensis* (Okamoto) (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(8): 792-797. [聂瑞娥, 杨星科, 刘志琦, 2008. 日本通草蛉 cDNA 文库构建及部分 ESTs 分析. 昆虫学报, 51(8): 792-797]

Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, de Silva AM, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor FS, Telford S, Anderson JF, Fikrig E, 2004a. TROSPA, an *Ixodes scapularis*

receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, 119(4): 457-468.

Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, Flavell RA, Norgard MV, Fikrig E, 2004b. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *Journal of Clinical Investigation*, 113(2): 220-230.

Pelz-Stelinski KS, Brlansky RH, Ebert TA, Rogers ME, 2010. Transmission parameters for *Candidatus* Liberibacter asiaticus by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(5): 1531-1541.

Subandiyah S, Nikoh N, Tsuyumu S, Somowiyarjo S, Fukatsu T, 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17(7): 983-989.

Tiwari S, Gondhalekar AD, Mann RS, Scharf ME, Stelinski LL, 2011. Characterization of five *CYP*4 genes from Asian citrus psyllid and their expression levels in *Candidatus* Liberibacter asiaticus-infected and uninfected psyllids. *Insect Molecular Biology*, 20(6): 733-744.

Zhao SL, Dai XJ, Liang JS, Liang CY, 2012. Surface display of rice stripe virus NSvc2 and analysis of its membrane fusion activity. *Virologica Sinica*, 27(2): 100-108.

Zou LY, Cao GC, Zhang Q, Zhang Y, Liang GM, Wu KM, Guo YY, 2011. cDNA library construction and EST analysis of the larval midgut of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(7): 739-745. [邹朗云, 曹广春, 张谦, 张彦, 梁革梅, 吴孔明, 郭予元, 2011. 棉铃虫中肠 cDNA 文库的构建及 EST 分析. 昆虫学报, 54(7): 739-745]

（责任编辑：赵利辉）